



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2003-0083650
Application Number

출원년월일 : 2003년 11월 24일
Date of Application NOV 24, 2003

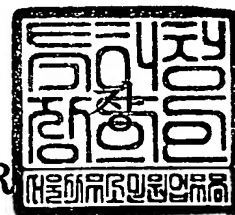
출원인 : 경상남도 외 1명
Applicant(s) KYONGSANGNAM-DO, et al.



2004 년 01 월 09 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【참조번호】 0001
【제출일자】 2003.11.24
【발명의 명칭】 돼지의 성장단계별 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색 및 이를 이용한 기능성 cDNA 칩
【발명의 영문명칭】 Screening expression profile of muscle specific genes expressed by growing stages in swine and functional cDNA chip prepared by using the same
【출원인】
【명칭】 경상남도
【출원인코드】 2-1998-700639-1
【출원인】
【성명】 김철욱
【출원인코드】 4-1998-025596-2
【대리인】
【성명】 이덕록
【대리인코드】 9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】 2003-050652-8
【포괄위임등록번호】 1999-048511-1
【발명자】
【성명】 김철욱
【출원인코드】 4-1998-025596-2
【발명자】
【성명의 국문표기】 여정수
【성명의 영문표기】 YE0,Jung Sou
【주민등록번호】 500510-1800817
【우편번호】 706-092
【주소】 대구광역시 수성구 지산2동 화성맨션 107동 301호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이정규
【성명의 영문표기】 LEE, Jung Gyu
【주민등록번호】 580303-1923714
【우편번호】 660-080
【주소】 경상남도 진주시 이현동 235-1번지 덕산아파트 407호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 송영민
【성명의 영문표기】 SONG, Young Min
【주민등록번호】 561025-1830315
【우편번호】 660-320
【주소】 경상남도 진주시 상대동 현대아파트 109동 1307호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조광근
【성명의 영문표기】 CH0, Kwang Keun
【주민등록번호】 591221-1531620
【우편번호】 130-080
【주소】 서울특별시 동대문구 이문동 삼성래미안아파트 203동 1304호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정기화
【성명의 영문표기】 CHUNG, Ki Hwa
【주민등록번호】 570505-1917220
【우편번호】 660-764
【주소】 경상남도 진주시 상대2동 상대한보아파트 103동 709호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김일석
【성명의 영문표기】 KIM, Il Suk
【주민등록번호】 570910-1772810



【우편번호】	442-370
【주소】	경기도 수원시 팔달구 매탄동 동남빌라 10동 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	진상근
【성명의 영문표기】	JIN,Sang Keun
【주민등록번호】	600518-1920513
【우편번호】	660-110
【주소】	경상남도 진주시 평거동 401번지 벽산 동신아파트 101동 903호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박수현
【성명의 영문표기】	PARK,Su Hyun
【주민등록번호】	750228-2829619
【우편번호】	660-010
【주소】	경상남도 진주시 중안동 1-1번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정지원
【성명의 영문표기】	JUNG,Ji Won
【주민등록번호】	800926-2831216
【우편번호】	660-340
【주소】	경상남도 진주시 상평동 275-73번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이민정
【성명의 영문표기】	LEE,Min Jung
【주민등록번호】	810527-2918414
【우편번호】	660-330
【주소】	경상남도 진주시 하대동 304-12번지
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권은정
【성명의 영문표기】 KWON, Eun Jung
【주민등록번호】 730525-2829214
【우편번호】 660-770
【주소】 경상남도 진주시 주악동 금호석류마을 110동 101호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조은석
【성명의 영문표기】 CHO, Eun Segk
【주민등록번호】 791228-1829221
【우편번호】 660-290
【주소】 경상남도 진주시 주악동 161-8번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조확래
【성명의 영문표기】 CHO, Hwok Rai
【주민등록번호】 790707-1891918
【우편번호】 636-803
【주소】 경상남도 의령군 의령읍 동동리 1063번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신선민
【성명의 영문표기】 SHIN, Sun Min
【주민등록번호】 830711-2829610
【우편번호】 660-300
【주소】 경상남도 진주시 가좌동 주공아파트 101동 1307호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 남희선
【성명의 영문표기】 NAM, Hee Sun
【주민등록번호】 831002-2829713

【우편번호】	660-080
【주소】	경상남도 진주시 이현동 우신파크맨션 1308호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍연희
【성명의 영문표기】	HONG,Yeon Hee
【주민등록번호】	770817-2923114
【우편번호】	660-080
【주소】	경상남도 진주시 이현동 유신맨션 1동 407호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍성광
【성명의 영문표기】	HONG,Sung Kwang
【주민등록번호】	641217-1930411
【우편번호】	667-911
【주소】	경상남도 하동군 진교면 양포리 산 100번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강양수
【성명의 영문표기】	KANG,Yang Su
【주민등록번호】	571101-1889812
【우편번호】	660-330
【주소】	경상남도 진주시 하대동 654-2 대영아파트 102동 1209호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	하영주
【성명의 영문표기】	HA,Young Joo
【주민등록번호】	570903-1917112
【우편번호】	664-910
【주소】	경상남도 사천시 곤양면 금정리 산 18번지
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 노정만
【성명의 영문표기】 ROU, Jeong Man
【주민등록번호】 611121-1925713
【우편번호】 676-804
【주소】 경상남도 함양군 함양읍 백천리 1463번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 광석준
【성명의 영문표기】 KWACK, Suk Chun
【주민등록번호】 530216-1845717
【우편번호】 660-778
【주소】 경상남도 진주시 하대2동 101번지 현대아파트 106동 1007호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최인호
【성명의 영문표기】 CHOI, In Ho
【주민등록번호】 640729-1253820
【우편번호】 157-220
【주소】 서울특별시 강서구 방화동 개화아파트 107동 902호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김병우
【성명의 영문표기】 KIM, Byeong Woo
【주민등록번호】 720505-1899319
【우편번호】 627-841
【주소】 경상남도 밀양시 상동면 금산리 147번지
【국적】 KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	7	면	7,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	5	항	269,000	원
【합계】	305,000	원		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 돼지의 성장단계별 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색 및 이를 이용한 기능성 cDNA 칩에 관한 것으로, 본 발명은 돼지의 근육과 지방 조직에서 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 근육특이유전자의 발현 프로파일을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기에서 검색된 근육특이유전자만을 집적하여 제조된 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 기능성 cDNA 칩은 돼지 품종별 육질의 평가 및 고육질의 돼지를 육성하는데 응용될 수 있다.

【색인어】

돼지, 근육특이유전자, 기능성 cDNA 칩, early stage muscle(ESM), adult stage muscle(ASM), 육질 진단

【명세서】

【발명의 명칭】

돼지의 성장단계별 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색 및 이를 이용한 기능성 cDNA 칩{Screening expression profile of muscle specific genes expressed by growing stages in swine and functional cDNA chip prepared by using the same}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 돼지의 성장단계별 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색 및 이를 이용한 기능성 cDNA 칩에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 돼지의 근육과 지방 조직에서 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 근육특이유전자의 발현 프로파일을 검색하고 이로부터 얻은 특이유전자만을 집적하여 제조된 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩에 관한 것이다.

<2> 재래 흑돼지는 등지방 두께가 두껍고 사료 효율과 성장률 및 생산율이 낮아 양돈 농가의 선호도가 낮았으나, 일반 개량종에 비해 단단한 지방 조직, 백색의 지방색, 좋은 질감, 풍부하고 담백한 육즙으로 우리 입맛에 맞는 풍미 때문에 최근 그 소비가 증가하고 있는 추세이다. 그러나 재래 돼지에 대한 유전적인 연구나 혈통 유지 관리, 육질 연관 유전자 분석에 대한 연구 결과는 아직까지 많이 미흡하다. 특히 육질에 관한 유전 형질은 육량에 관한 형질과는 달리 보다 많은 유전 형질에 대한 복합적인 결과로서 이에 대한 연구 결과는 많지 않다 (Cameron, 1993).

<3> 현재까지 알려져 있는 돼지에서 육질에 영향을 미치는 중요한 유전자로는 PSE (pale, soft, exudative) 돈육의 원인이 되는 ryanodine receptor gene (RYR) (Eikelenboom과 Minkema, 1974; Smith와 Bampton, 1977; Webb, 1981; Christian과 Mabry, 1989; Fujii 등, 1991), 산성육 (acid meat) 유전자 (Rendement Napole, Le Roy 등, 1990; Lundstrom 등, 1996)가 있다. 그 외에는 QTL (quantitative trait loci) 분석에 의한 육질 연관 염색체 구역이나 여러 가지 후보유전자 (candidate gene)가 알려져 있다. 7번 염색체에 존재하는 swine leucocyte antigen (SLA) 복합체 (Geffrotin 등, 1984)와 이 부근에 위치하는 micorsatellite marker S0064, S0066, S0102나 TNF 는 등지방 두께, 등심 단면적, 육질 형질, 웅취 (boar taint)와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다 (Jung 등, 1989; Rothschild 등, 1995; Bidanel 등, 1996). 그리고 microsatellite marker S0001~S0175 위치에서 등지방 두께와 복부 지방 함량과 연관된 QTL이 존재한다고 밝혀져 있고 (Andersson 등, 1994), 호르몬들의 조절인자로 알려진 뇌하수체 특이 전사 인자 (pituitary-specific transcription factor; PIT1) 유전자도 등지방 두께와 연관되어 있는 것으로 보고되었다 (Yu 등, 1995). 근내 지방 함량 (Intramuscula fat content; IMF)은 고기의 부드러움 (tenderness), 수분량 (juiciness), 그리고 맛에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Devol 등, 1988; Cameron, 1990). 근내 지방 함량에 영향을 미치는 유전자로는 H-FAPB (heart-fatty acid binding protein)가 보고된 바 있고 (Gerbens 등, 1997), 6번 염색체에 존재하는 microsatellite SW1823~S0003 (74~79cM) 위치에서도 이와 의 연관성이 연구되었다 (Grindflek 등, 2001).

<4> 이와 같이 4번, 6번, 7번 염색체에서 주로 육질 형질에 영향을 미치는 QTL이 많이 보고됨에 따라 (Clamp 등, 1992; Andersson 등, 1994; Renard 등, 1996; Rohrer와 Keele 1998a,

1998b; Wang 등, 1998; de Koning 등, 1999; Ovilo 등, 2000; Gerbens 등, 2000), 이 염색체들을 중심으로 한 육질 관련 마커 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

<5> 지난 몇 년 동안, 돼지의 육질과 관련한 익명의 유전자 마커와 알려진 유전자로 구성된 유전자 지도를 개발하고자 하는 노력이 있어왔다. 종래에는 돼지에 존재하는 유전적 차이를 시험하기 위해 노던 블랏팅, 디퍼렌셜 디스플레이, 유전자 발현의 순차적 분석 및 닛 블랏 분석과 같은 mRNA 수준에서 유전자 발현을 분석하는 몇몇 기술들이 사용되었지만, 이들 방법들은 다수의 발현 산물들을 동시에 분석하는데 있어서는 부적절한 단점을 가지고 있었다. 최근에는 이러한 단점들을 보완하기 위해 cDNA 마이크로어레이와 같은 신기술이 개발되었다. cDNA 마이크로어레이는 많은 생물들에서 유전자 발현을 연구함에 있어 가장 강력한 수단이 되고 있다. 이 기술은 폴리몰피즘 스크리닝과 유전체 DNA 클론의 맵핑 뿐만 아니라 수많은 유전자들의 동시 발현과 대규모의 유전자 발견에 적용되었다. 이미 알려져 있거나 혹은 미확인의 유전자들로부터 전사된 RNA를 정량적으로 분석하는 고도의 RNA 발현 분석 기술인 것이다.

<6> 현재 사용되고 있는 DNA 칩 타입에는 데이터 베이스 정보를 기반으로 프라이머를 설계하여 cDNA 라이브러리에서 유전자를 모아 제작한 종합적 DNA 칩과 기존의 문헌 등을 근거로 관련 유전자를 모아 제작한 기능별 DNA 칩이 있다. 종합적 DNA 칩을 이용하여 해석하는 경우에는 관련없는 유전자의 작용으로 인한 해석의 어려움과 최종적으로 생물학적인 역할을 해석할 때 방대한 노력이 필요하고, 데이터 베이스를 근거로 하므로 신규유전자가 없을 수도 있고, 관계하는 유전자 일부의 누락 가능성 등의 어려움이 있다. 한편, 기능별 DNA 칩은 해석하기 쉽지만 기존의 문헌에 기재되지 않은 유전자나 기능이 알려져 있지 않은 유전자를 특정화 하려는 경우 다시 한번 유전자를 수집하여야 할 필요가 있다. 따라서, 효과적인 해석을 위해서는 칩상의 DNA 구성이 매우 중요하다.

<7> 이점에 착안하여 본 발명자는 돼지의 특정 조직에서 육질에 관여하는 유전자의 발현 프로파일을 검색함에 있어 cDNA 마이크로어레이 기술을 도입하고 이로부터 밝혀진 특이유전자만을 집적한 기능성 cDNA 칩을 제작하여 고육질의 종돈 개량 및 품종별, 조직별 육질 평가에 응용하고자 하였다.

<8> 따라서, 본 발명의 목적은 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA로부터 제작한 프로브를 집적한 기질에 돼지의 근육과 지방 조직에서 얻은 표적 DNA를 혼성화시켜 근육의 성장 단계에 따라 차별적으로 발현되는 특이유전자의 발현 프로파일을 검색하고자 한다.

<9> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기에서 검색된 특이유전자만을 집적하여 제작한 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩을 제공하고자 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 본 발명의 상기 목적은 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA로부터 PCR을 통해 수천개의 ESTs를 얻고 이를 클로닝하여 염기서열을 데이터베이스에서 분석 및 검색하고, PCR를 통해 상기 ESTs를 증폭한 후 분리 정제하여 DNA 칩 어레이를 이용하여 대조군과 함께 슬라이드에 어레이한 다음, 근육특이유전자의 발현 프로파일을 검색하기 위해 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA로부터 표적 DNA를 제조하고, 상기 슬라이드(프로브 DNA)와 표적 DNA를 혼성화(hybridization)시킨 다음, 이를 스캐닝하고 이미지 파일을 분석하여 돼지의 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 근육특이유전자의 발현양상을 조사한 후, 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자만을 집적한 기능성 cDNA 칩을 제작함으로써 달성하였다.

【발명의 구성 및 작용】

- <11> 본 발명은 돼지의 근육과 지방 조직에서 ESTs의 확보 및 염기서열 정보 확인단계; 상기 ESTs를 이용하여 프로브 DNA 제조단계; 돼지의 근육과 지방 조직에서 얻은 형광물질이 결합된 표적 DNA(ESTs)와 상기 프로브 DNA의 혼성화, 스캐닝 및 이미지 파일 분석단계; 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자의 발현 프로파일 검색; 및 상기의 근육특이유전자만을 집적한 기능성 cDNA 칩의 제작단계로 구성된다.
- <12> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩은 하기의 단계로 제조됨을 특징으로 한다:
- <13> 돼지의 근육과 지방조직에서 분리한 총 RNA로부터 PCR을 통해 4434개의 ESTs를 얻고,
- <14> DNA 칩 어레이를 이용하여 상기 ESTs를 효모대조군과 함께 슬라이드에 어레이하고,
- <15> 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA로부터 시아닌 3-dCTP 또는 시아닌 5-dCTP이 결합된 표적 DNA를 제조하고,
- <16> 상기 슬라이드(프로브 DNA)와 표적 DNA를 혼성화(hybridization)시키고 이를 스캐닝하고 이미지 파일을 분석하여 돼지의 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 근육특이유전자의 발현양상을 조사하고,
- <17> 상기에서 검색된 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자만을 집적한 기능성 cDNA 칩을 제작함.
- <18> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩은 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 근육특이유전자로 구성된 프로브 및 상기 프로브가 고정된 기질을 포함함을 특징으로 한다.

- <19> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA는 ESM-특이유전자와 ASM-특이유전자를 포함함을 특징으로 한다.
- <20> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 돼지의 ESM-특이유전자는 액틴, 베타-미오신, 글리코젠 포스포릴라아제, 미오신 헤비 체인, 피루베이트 키나아제 및 트로포닌 C 코딩 유전자를 포함함을 특징으로 한다.
- <21> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 돼지의 ASM-특이유전자는 1-알파 디네인 헤비 체인, 601446467F1, 피브로넥틴 전구체 및 MHC class I 코딩 유전자를 포함함을 특징으로 한다.
- <22> 본 발명 기능성 cDNA 칩의 기질은 실리콘 웨이퍼, 유리, 폴리카보네이트, 멤브레인, 폴리스틸렌 또는 폴리우레탄과 같은 고분자 필름이 바람직하다. 본 발명 DNA 마이크로어레이는 통상의 DNA 마이크로어레이 제조방법으로 프로브를 기질에 고정시켜 제조할 수 있으며, 포토리소그래피방법, 압전인쇄방법, 마이크로 피펫팅, 스팟팅 등의 방법을 사용할 수 있으며, 본 발명은 스팟팅 방법을 사용하였다.
- <23> 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 키트는 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자가 집적된 기능성 cDNA 칩, Cy5-dCTP 또는 Cy3-dCTP과 결합시킨 검색 조직의 RNA에서 얻은 cDNA, 형광스캐닝시스템 및 컴퓨터분석시스템으로 이루어짐을 특징으로 한다.
- <24> 이하, 본 발명의 구체적인 구성을 실시예를 통해 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <25> [실시예]
- <26> 실시예 1 : 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색

<27> 돼지의 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 근육특이유전자를 검색하기 위해, 가고시마 버크셔종의 근육과 지방 조직에 분리한 총 RNA로부터 프로브 DNA를 제작하고, 상기 조직의 총 RNA에 형광물질을 결합시켜 표적 DNA를 제작하여 이들을 혼성화 시킨 다음 스캐닝하고 이미징 파일을 분석하여 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자의 발현 프로파일을 검색하였다.

<28> 제조예 1: 프로브 DNA의 제조 및 어레이

<29> 우선, 슬라이드글라스에 부착하기 위해 PCR에 의해 증폭된 cDNA인 프로브 DNA를 제작하였다. 가고시마 버크셔종(체중이 30 kg 및 90 kg인 것을 선택함)의 등심부위의 근육 및 지방조직에서 RNA 분리 키트(독일 퀴아젠사)를 사용하여 메뉴얼에 따라 총 RNA를 분리하고 oligo(dT) column을 이용하여 mRNA를 분리하였다. 상기 에서 분리한 mRNA 시료에 SP6, T3 정방향 프라이머, T7 역방향 프라이머(영국 아머샴 파마시아 바이오테크)를 사용하여 RT-PCR을 실시하고 cDNA를 합성하였다. 각 PCR 반응물의 총 부피는 100 μ l로 하였다. 100 pM의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머 각각을 96-웰 PCR 플레이트(영국 제네틱스)에 옮겼다. 각 웰에는 2.5 mM dNTP, 10 \times PCR 버퍼, 25 mM MgCl₂, 0.2 μ g의 DNA 주형, 2.5 유닛의 Taq 폴리머라아제가 포함되게 하였다. PCR은 GeneAmp PCR 시스템 5700(캐나다 AB 어플라이드 바이오시스템)에서 다음의 조건 하에서 실시하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 총 30 사이클.

<30> 증폭된 DNA의 크기는 아가로우즈 젤 전기영동에서 확인하였다. PCR 산물을 96-웰 플레이트에서 에탄올 침전을 실시한 후 건조시켜 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

<31> 상기에서 준비된 총 4434개의 cDNA(ESTs)를 클로닝하여 돼지가 가지고 있는 유전자의 염기서열을 분석하고, 이들의 정보는 NCBI를 통해 알아내었다. 정보를 가진 유전자들을 다시 PCR

을 통해 분리정제한 다음, 총 4434개의 cDNA(ESTs)가 놓여질 자리와 배치도를 만든 후, 총 4434개의 cDNA(ESTs)와 300개의 효모 대조군을 1.7 cm^2 면적에 배열하였다. 그 후, 마이크로그리드 II(바이오로보틱스)를 이용하여 CMT-GAPSTM 아미노실레인(aminosilane)이 코팅된 현미경용 슬라이드글라스(코닝사 제품)에 프로브 DNA를 점적하였다. 스플릿 핀을 이용하여 마이크로그리드 II(MicroGrid II)로 프로브 DNA를 프린트하였다. 그 후 핀 장치를 마이크로플레이트 내 웰에 접근시켜 상기 용액을 슬라이드글라스에 주입하였다(1~2 nL). 프로브 DNA를 프린팅한 후, 슬라이드를 건조시키고, 점적시킨 DNA와 슬라이드를 스트라타링커TM(미국 스트라타진)을 이용하여 90 mJ에서 UV-크로스링킹으로 결합시키고, 실온에서 2분 동안 0.2% SDS로 두 번 세척하고, 실온에서 2분 동안 3차 증류수로 한번 세척하였다. 세척 후, 슬라이드를 95℃ 수조에 2분 동안 침지시키고, 억제제(blocking solution, pH7.4의 인산염 완충액 300 mL에 1.0 g NaBH_4 를 녹인 용액과 무수 에탄올 100 mL를 혼합한 용액)를 첨가하여 15분 동안 차단하였다. 그 후, 상기 슬라이드를 실온에서 1분 동안 0.2% SDS로 3번 세척하고, 실온에서 2분 동안 3차 증류수로 한번 세척하고, 대기 중에서 건조시켰다.

<32> 제조예 2: 표적 DNA의 제조 및 혼성화(hybridization)

<33> 돼지 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 근육특이유전자를 검색하기 위한 표적 DNA를 제조하기 위해, 체중 30 kg(ESM, early stage muscle)과 90 kg(ASM, adult stage muscle)의 가고시마 버크셔종(Kagoshima Berkshire)에서 등심부위(longissimus dorsi) 근육조직을 채취하였다. 지방 조직은 체중 30 kg(ESF, early stage fat)의 가고시마 버크셔종에서 얻었다. 근육과 지방조직을 5~8 mm 길이로 자른 다음 액체질소로 냉동시켜 -70℃에서 보관하였다.

<34> 표적 DNA를 제조하기 위해 트리졸™ 키트(라이프 테크놀로지) 매뉴얼에 따라 0.2~1.0 g의 실험군과 대조군 조직에서 총 RNA를 분리하였다. 글래스-테프론 또는 폴리트론 균질기로 조직 50-100 mg 당 1 mL의 트리졸™을 조직 시료에 넣고 파쇄하였다. 4℃에서 12,000 g으로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 1 mL씩 분취(aliquot)하였다. 여기에 200 μ L의 클로로포름을 첨가하고 15초 동안 볼텍싱하고 15분 동안 얼음에 놓아 둔 후 4℃에서 12,000 g로 10분 동안 원심분리하였다. 동량의 클로로포름을 첨가하고 15초 동안 볼텍싱한 후 15분 동안 얼음에 놓아두었다. 이를 4℃에서 12,000 g로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 새 튜브로 옮기고 500 μ L의 이소프로판올을 첨가하고 볼텍싱하고 얼음에 15분 동안 놓아두었다. 얼음을 냉각시키고 4℃에서 12,000 g로 5분 동안 원심분리하고 상등액을 분리하고 여기에 75% 냉 에탄올 1 mL을 첨가한 후 4℃에서 12,000 g로 5분 동안 원심분리하였다. 상등액을 취하여 클린벤취에서 30분 동안 얼음에서 건조시킨 다음 RNase가 제거된 물이나 DEPC 물 20 μ L로 RNA를 녹였다. 총 DNA 농도를 40 μ g/17 μ L로 하여 전기영동을 준비하였다.

<35> 표준 펄스트 스트랜드 cDNA 합성법(standard first-strand cDNA)에 따라 표적 DNA를 얻었다. 간단히 말해, Schuler(1996)의 방법에 따라, 총 RNA 40 μ g과 올리고 dT-18mer 프라이머(인비트로젠 라이프 테크놀로지)를 혼합하고 이를 65℃에서 10분 동안 가열한 후 4℃에서 5분간 냉각하였다. 그 후, 1 μ L의 25 mM dATP, dGTP 및 dTTP 혼합액, 1 μ L의 1 mM dCTP(프로메가) 및 2 μ L의 1 mM 시아닌 3-dCTP 혹은 2 μ L의 1 mM 시아닌 5-dCTP, 20 units의 RNase 저해제(인비트로젠 라이프 테크놀로지), 100 units의 M-MLV RTase, 2 μ L의 10 \times 펄스트 스트랜드 완충액을 첨가한 후 피펫을 이용하여 혼합하였다. 반응혼합액을 38℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 에탄올 침전에 따라 미결합 상태의 뉴클레오티드를 제거하였다. 이때 사용한 물은 DEPC 처리된 살균수를 사용하였다.

- <36> 상기에서 제조한 슬라이드에 혼성화 용액(5×SSC, 0.2% SDS, 1 mg/mL 청어 정자 DNA)으로 65℃에서 1시간 동안 미리 혼성화(prehybridization)시켰다. 시아닌 3(Cy-3)와 시아닌 5(Cy-5)로 표지된 표적 DNA는 20 μ l의 혼성화 용액으로 재현탁하고 95℃에서 2분 동안 변성시켰다. 그 후, 슬라이드와 상기 용액을 65℃에서 밤새도록 혼성화시켰다. 상기 과정은 습윤 챔버에서 커버글라스(그레이스바이오랩)를 덮고 실시하였다.
- <37> 혼성화 후, 슬라이드는 2×SSC, 0.1% SDS 혼합액으로 실온에서 5분 동안 댄싱 셰이커(Dancing shaker)에서 격렬하게 교반하면서 4번 세척하였다. 그 후, 상기 슬라이드를 0.2×SSC로 5분 동안 2번 세척하고, 0.1×SSC로 실온에서 5분 동안 세척하였다.
- <38> 상기 슬라이드는 스캔어레이 5000(GSI 루모닉스 버전 3.1)에서 50 μ m의 픽셀 사이즈로 스캔하였다. 시아닌 3-dCTP로 표지된 표적 DNA는 565 nm에서 스캔하고, 시아닌 5-dCTP로 표지된 표적 DNA는 670 nm에서 스캔하였다. 2개의 형광강도는 시아닌 3-dCTP, 시아닌 5-dCTP로 표지된 스팟의 선 스캐닝에 따라 표준화하였다. 다시 상기 슬라이드를 스캔어레이 4000XL에서 10 μ m의 픽셀 사이즈로 스캔하였다. 이로부터 얻은 TIFF 이미지 파일을 퀀트어레이 소프트웨어 버전 2.1(Quantarray software version 2.1)에서 분석하고, 배경을 자동제거하였다. 각 스팟의 강도는 퀀트어레이에서 마이크로소프트 엑셀로 변환하였다. 그 결과를 표 1과 2에 나타내었다.
- <39> 미성숙기 근육(ESM, early stage muscle)의 전체적인 유전자 발현 패턴을 성숙기 근육(ASM, adult stage muscle)과 미성숙기 지방(ESF, early stage fat)의 것과 비교하였다. "ESM-특이" 및 "ASM-특이" 유전자는 표 1에 나타내었고, "ESF-특이" 유전자는 표 2에 나타내었다. 20개의 유전자가 ESM에서 보다는 ASM에서 5배 이상 높은 발현을 나타내었다. 또한, 18개의 유전자는 ESM에서 보다는 ESF에서 5 내지 10배 높은 발현을 나타내었다. 또한, ASM에서 보다는 ESM에서 5 내지 10배 높은 발현을 나타내었다.

<40> 예측되는 유전자군을 포함하여, ASM-특이 유전자, ESM-특이 유전자, ESF-특이 유전자 중
 몇몇은 표 1과 2에 나타내었다.

<41> 【표 1】

ESM 과 ASM에서 달리 발현되는 유전자의 발현 비율

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율
			ESM(30)/ASM(90)
세포 구조 및 이동상			
SM2149	CAB56598	1-alpha dynein heavy chain	-2.1
SM781	NP_033891	19 kDa-interacting protein 3-like	+2.1
SM635	BAB19361	Actin	+3.4
SM713	AAA51586	Actin	+6.3
SM106	P53506	Actin	+8.8
SM1068	AAF20165	Actin	+5.3
SM363	B25819	Actin	+4.3
SM768	X52815	Actin	+3.4
SMk77	NM_001100	Actin, alpha 1	+15.1
SM128	NP_033740	Actin, gamma 2	+6.9
SM902	BC001748	Annexin A2	-3.2
SM846	P81287	Annexin V	-2.8
SM653	P04272	Annexin II	-2.2
SMk340	U75316	Beta-myosin heavy chain mRNA	+3.0
SM1605	AAF99682	Calpain large polypeptide L2	+4.7
SM541	NP_000079	Collagen	-3.2
SM715	L47641	Collagen	-6.8
SM430	Q9XSJ7	Collagen alpha 1	-6.8
SM758	CGHU1S	Collagen alpha 1	-2.1
SM62	CGHU2V	Collagen alpha 2	-3.2
SM949	O46392	Collagen alpha 2	-3.3
SM410	CAA28454	Collagen(alpha V)	-2.3
SM1651	XM_039583	Discs, large(Drosophila) homolog 5	-2.0
SM1050	AAA30521	Fibronectin	-2.4
SM491	NM_005529	Heparan sulfate proteoglycan 2	-2.2
SM1573	XM_044160	Lamin A/C	+2.6
SMk55	NP_006462	Myosin	+3.9
SMk338	P79293	Myosin heavy chain	+2.0
SMk168	AB025261	Myosin heavy chain	+9.0
SM1732	NP_004678	Myotubularin related protein 4	+3.8
SM1691	NP_000908	Procollagen-proline	-2.3
SM690	NP_003109	Secreted protein, acidic	-4.4
SMk173	X66274	Tropomyosin	+2.6
SM141	CAA38179	Tropomyosin	+2.7
SMk51	P18342	Tropomyosin, alpha chain	+9.6
SM1043	P06469	Tropomyosin alpha chain	+11.5
SMk19	P02587	Troponin C	+14.5
SMk50	Y00760	Troponin-C	+19.6
SMk57	AAA91854	Troponin-C	+14.6
SM1535	P02554	Tubulin beta chain	+2.8
SM1063	P20152	Vimentin	5.4

<42>

대사

SMk56	AAA37210	Aldolase A	+5.5
SM995	CAA59331	Carbonate dehydratase	+3.2
SMk344	NM_012839	Cytochrome C	+3.4
SM800	AAG53955	Cytochrome c oxidase subunit I	+3.0
SM51	T10974	Cytochrome-c oxidase	+3.8
SMk151	CAA06313	Fructose-1,6-bisphosphatase	+7.1
SM2070	P00339	L-lactate dehydrogenase M chain	+12.7
SMk120	AJ275968	LIM domains 1 protein	+8.6
SMk147	X59418	NADH dehydrogenase	+2.4
SM928	079874	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	+5.3
SMk18	AAG28185	NADH4L	+2.1
SMk81	O19094	Octanoyltransferase(COT)	+3.2
SM295	AB006852	Phosphoarginine phosphatase	+2.6
SMk346	M97664	Phosphoglucomutase isoform 2 mRNA	+5.5
SM36	TVMVRR	Protein-tyrosine kinase	+4.3
SM887	P11980	Pyruvate kinase	+8.5
SM698	S64635	Pyruvate kinase	+9.7
SM723	P52480	Pyruvate kinase	+7.3
SMk79	U44751	Pyruvate kinase	+5.2
SMk135	Z98820	Pyruvate kinase	+3.0
SM1033	XM_018138	Sarcosine	+2.9
SMk347	X99312	Tyrosine phosphatase type IVA UDP glucose pyrophosphorylase	+3.0

유전자/단백질 발현

SM75	U09823	Elongation factor 1 alpha	-4.3
SM1989	AAH05660	Elongation factor 1 alpha 1	-3.9
SMk61	NP_031959	Enolase 3	+3.6
SM968	Y00104	Repetitive dna sequence element RPE-1	-2.5
SMk91	AAC48501	Reticulum protein	+4.6
SM2083	NP_003083	Ribonucleoprotein polypeptide B	+3.1
SM896	AAH01127	Ribosomal protein	+2.0
SM1668	AAH07512	Ribosomal protein L18a	+2.1
SM1784	228176	Ribosomal protein P0	+6.2
SM1801	AAA30799	Transfer RNA-Trp synthetase	+6.0
SM997	51077272	Translation initiation factor eif1	+3.5

<43>

세포 신호전달/교환			
SM464	AJ002189	Complete mitochondrial DNA	+3.9
SM732	AF304203	Mitochondrion	+5.9
SMk11	XM_006515	Potassium channel	-2.4
SMk187	BC007462	Similar to creatine kinase	+3.5
세포분열			
SM1067	XP_007399	Protease, cystein, 1	+3.1
면역반응			
SM154	AF036005	Interleukin-2 receptor alpha chain	-2.5
SMk1	AAAG52886	Kel-like protein	+6.4
SM401	AJ251829	MHC class I SLA genomic region	-3.0
EST			
SM824	AK023385	cDNA flj13323 fis	+2.5
SM1776	XM_050494	KIAA0182 protein	+3.6
SM1556	XP_043678	KIAA1096 protein	+4.9
미확인			
SM1785	AC015998	AC015998	+2.1
SM2152	BI327422	AR078G01iTHYEG01S	-4.0
SM1469	BG938561	Cn26h08.x1	-2.2
SM908	AAG28205	COI	+2.8
SM851	AAG28192	COI	+3.6
SM1738	CAA19420	DJ466P17.1.1(Laforin)	+4.8
SM1007	AAD31021	Foocen-m	+3.8
SM1920	BE421626	HWM012cA.1	+3.3
SM1972	XP_039195	Hypothetical protein	+3.2
SM1536	T08758	Hypothetical protein	+4.7
SMk137	XP_002275	Hypothetical protein	+20.0
SM1724	XP_016035	Hypothetical protein	-2.6
SM1539	AT001097	Mandarina library	-2.3
SM1474	BG384994	MARC 1PI	+2.6
SM1853	BF198401	MARC 2PIG	+3.6
SM1941	BE925069	MR1-AN0039-290800-004-a01	+4.4
SM379	AW328623	NIH_MGC_4	+2.3
SM1911	BE872239	NIH_MGC_65	-2.4

<44> 미확인

SM1676	BG548727	NIH_MGC_77	+5.1
SM1914	BG534187	NIH_MGC_77	-2.3
SM1650	BI337009	Peripheral Blood Cell cDNA library	+9.3
SM1064	BAB28119	Putative	+3.4
SM618	BAB28422	Putative	+2.1
SM1774	BAB30715	Putative	+3.2
SM1690	BF864360	Reinhardtii CC-1690	+2.2
SM1898	F23148	Small intestine cDNA library	-2.3
SM96	M17733	Thymosin beta-4 mRNA	-4.2
SM1922	AAH03026	Unknown	+4.0
SM210	BAA91923	Unnamed protein product	-3.1

일치하지 않음

SM107		No match	-2.4
SM278		No match	-2.2
SM384		No match	-2.3
SMk37		No match	+7.7
SM717		No match	-3.0
SM1598		No match	+4.5
SMk6		No match	+3.8
SMk68		No match	+5.0
SM1100		No match	-2.6
SMk70		No match	+3.9
SMk80		No match	+17.7
SMk112		No match	+3.5
SM1639		No match	-4.0
SMk148		No match	+3.8
SM1665		No match	+3.8
SM1665		No match	+13.0
SMk95		No match	+2.7
SMk133		No match	+2.4
SMk152		No match	+6.4
SM1897		No match	+3.4
SMk138		No match	+10.3
SM1902		No match	+2.1
SMk342		No match	+6.7
SMk181		No match	+11.0
SM904		No match	-3.4
SMk262		No match	+3.9
SM9		No match	+2.4
SM1964		No match	+2.6
SMk335		No match	-3.9

<45> †: 일치하는 Accession no.

<46> **: 데이터베이스와 일치하는 정보

<47> No match: 데이터베이스에서 일치하는 정보가 없음; 신규한 EST

<48> ESM: early stage muscle(체중 30 kg), ASM: adult stage muscle(체중 90 kg)

<49> SM: 돼지 근육

<50> 표 1에 나타난 바와 같이, ASM에서 발현되고, 표 1에서 동정되고 기능면에서 잘 알려져 있는 14개의 유전자들은 아직 정확하게 측정된 적이 없었다. 이들 유전자들로는 액틴 알파 1, 트로포미오신 알파 체인, 알돌라아제 A, 프룩토우즈-1,6-비스포스파타아제, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타아제 체인 1, 포스포글루코뮤타아제 이소폼 1 mRNA, 피루베이트 키나아제, 미토콘드리아 리온, 켈 유사 단백질이 있다(표 2). 마이크로필라멘트로 구성되어 있는 액틴 사이토스켈레톤은 진핵세포에서 세포 내외 운동 및 구조 지지 기능을 포함하여 다양한 역할들을 담당하고 있다. 액틴은 단량체(G-액틴) 또는 실모양(F-액틴)으로써 존재한다. F-액틴은 마이크로필라멘트의 주 성분이다. 다수의 단백질들이 마이크로필라멘트의 길이, 위치 및 변형을 조절하고 있다. 액틴 사이토스켈레톤은 자극에 대한 반응과 세포주기진행 시 재빨리 모양과 구조를 변형시키는 유동적 구조이다. 액틴 사이토스켈레톤의 구조는 고정되어 있지 않고 세포 환경에 반응하여 변한다. 트로포닌 복합체(troponin-I, -T 및 C)와 결합되어 있는 트로포미오신은 척추동물의 선근육의 수축 시 Ca^{2+} 의존적 조절에서 중추적인 역할을 담당하고 있다. 트로포미오신은 이량체로 된 알파 코일드 코일 구조를 갖는 단백질군과 가깝게 연결되어 있다. 포유동물의 PEP에서 ADP로의 트랜스포스포릴레이션(transphosphorylation)을 촉매하는 피루베이트 키나아제는 주요 조절효소이며, 대사경로의 조절 특징들은 경로 작동 시 다른 조직에서 필요로 하는 다양한 대사적 요구에 밀접하게 관여하므로 본 발명자는 이를 조사 대상으로 삼았다.

<51> 또한, ESM에서 발현되고 표 1과 2에서 동정되고 기능이 잘 알려져 있는 5개의 유전자들은 아직 정확하게 측정된 적이 없었다. 이들 유전자들로는 콜라겐, 디스크/라지 호몰로그 5(초파리), 산성의 분비 단백질, 비멘틴이 있다. 콜라겐은 세포외 매트릭스의 주 성분이며, 적어도

18종의 이중 거대 단백질군으로 이루어져 있다. 이들은 배 발생과정과 다양한 형태분화과정 동안 세포분열, 증식, 이주 및 부착 시 관찰되며, 주변의 세포의 매트릭스의 세포상호작용에 의해 부분적으로 조절된다. 비멘틴 코딩 유전자(Vim)의 발현은 백혈구의대식세포로의 분화과정에서 일어나는 일련의 유전적 사건들을 거친 후 나타나는 말기 표지인자(terminal marker) 중 하나이다. 따라서, Vim의 전사조절메카니즘의 평가는 백혈구 분화에 관여하는 유전적 조절 경로를 이해하는데 중요한 단계일 것이다.

<52> 【표 2】

ESM 과 ESF 에서 달리 발현되는 유전자의 발현 비율

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율
			ESF(30)/ESM(30)
세포 구조 및 이동상			
SM2149	CAB56598	1-alpha dynein heavy chain	-2.1
SM781	NP_033891	19 kDa-interacting protein 3-like	+2.2
SM1068	AAF20165	Actin	+4.5
SM635	BAB19361	Actin	+2.6
SM106	P53506	Actin	+4.9
SM768	X52815	Actin	+2.4
SM363	B25819	Actin	+3.7
SM713	AAA51586	Actin	+5.6
SMk77	NM_001100	Actin, alpha 1	+4.5
SM128	NP_033740	Actin, gamma 2	+3.9
SM1091	JC5971	Alpha-b crystallin	+2.1
SM902	BC001748	Annexin A2	-4.2
SM846	P81287	Annexin V	-3.5
SM653	P04272	Annexin II	-2.3
SMk340	U75316	Beta-myosin heavy chain mRNA	+2.2
SM1807	AAF99682	Calpain large polypeptide L2	+2.7
SM541	NP_000079	Collagen	-4.9
SM715	L47641	Collagen	-5.2
SM1023	Q9XSJ7	Collagen alpha 1	-4.6
SM758	CGHU1S	Collagen alpha 1	-4.3
SM62	CGHU2V	Collagen alpha 2	-4.4
SM949	O46392	Collagen alpha 2	-3.2
SM410	CAA28454	Collagen(alpha V)	-2.3
SM1121	NM_000393	Collagen, type V, alpha 2	-2.8
SM53	NP_000384	Collagen, type V, alpha 2	-2.5
SM1651	XM_039583	Discs, large(Drosophila) homolog 5	-8.6
SM1050	AAA30521	Fibronectin	-3.1
SM381	FNHU	Fibronectin precursor	-2.6
SM122	P07589	Fibronectin(FN)	-2.5
SM1573	XM_044160	Lamin A/C	+2.1
SMk55	NP_006462	Myosin	+3.6
SMk168	AB025261	Myosin heavy chain	+5.0
SM1732	NP_004678	Myotubularin related protein 4	+4.7
SM690	NP_003109	Secreted protein, acidic	-5.2
SM1043	P06469	Tropomyosin alpha chain	+8.6
SMk173	X66274	Tropomyosin	+2.2
SMk19	P02587	Troponin C	+6.9
SMk57	AAA91854	Troponin-C	+7.1
SMk50	Y00760	Troponin-C	+9.0
SM1535	P02554	Tubulin beta chain	+3.3
SM1063	P20152	Vimentin	-5.1
SM730	CAA69019	Vimentin	-3.2

<53>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESF(30)/ESM(30)
대사			
SMk344	NM_012839	Cytochrome C	+2.4
SM800	AAG53955	Cytochrome c oxidase subunit I	+2.9
SMk151	CAA06313	Fructose-1,6-bisphosphatase	+4.2
SMk254	231300	Glycogen Phosphorylase b	+2.6
SM2070	P00339	L-lactate dehydrogenase M chain	+10.6
SM928	079874	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	+3.2
SMk81	019094		+3.9
SM295	AB006852	Octanoyltransferase(COT)	+2.3
SMk346	M97664	Phosphoarginine phosphatase	+3.3
SM36	TVMVRR	Phosphoglucomutase isoform 2 mRNA	+2.6
SM723	P52480	Protein-tyrosine kinase	+7.5
SM698	S64635	Pyruvate kinase	+6.6
SM887	P11980	Pyruvate kinase	+6.3
SM1594	AAA62278	Pyruvate kinase	-3.2
SM1033	XM_018138	Superoxide dismutase	+2.2
		Tyrosine phosphatase type IVA	
유전자/단백질 발현			
SM75	U09823	Elongation factor 1 alpha	-3.7
SM1989	AAH05660	Elongation factor 1 alpha 1	-3.8
SMk120	AJ275968	LIM domains 1 protein	+9.9
SMk91	AAC48501	Reticulum protein	+2.1
SM2083	NP_003083	Ribonucleoprotein polypeptide B	+3.2
SM21	NP_000994	Ribosomal	+2.2
SM1784	228176	Ribosomal protein P0	+5.5
SM1820	BC014277	Tissue inhibitor of	-2.6
SM1801	AAA30799	metalloproteinase 3	+5.7
SM997	51077272	Transfer RNA-Trp synthetase	+2.3
		Translation initiation factor eif1	
세포 신호전달/교환			
SM464	AJ002189	Complete mitochondrial DNA	+2.7
면역반응			
SMk1	AAG52886	Kel-like protein 23	+4.6
미확인			
SM2152	BI327422	AR078G01iTHYEG01S	-5.5
SMk3	AL13277	Chromosome 14 DNA sequence	+2.3
SM908	AAG28205	COI	+2.2
SM1738	CAA19420	DJ466P17.1.1(Laforin)	+3.5
SM1007	AAD31021	Foocen-m	+3.0
SM1724	XP_016035	Hypothetical protein	-2.6
SMk137	XP_002275	Hypothetical protein	+10.0
SM1972	XP_039195	Hypothetical protein	+2.8
SM787	AF192528	Integrin beta-1 subunit	+2.0
SM1474	BG384994	MARC 1PI	+2.8
SM1676	BG548727	NIH_MGC_77	+2.3

<54>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESF(30)/ESM(30)
미확인			
SM1650	BI337009	Peripheral Blood Cell cDNA library	+7.3
SM1774	BAB30715	Putative	+5.1
SM1064	BAB28119	Putative	+3.0
SM1690	BF864360	Reinhardtii CC-1690	+2.5
SM96	M17733	Thymosin beta-4 mRNA	-3.9
SM1922	AAH03026	Unknown	+4.7
일치하지 않음			
SMk58		No match	+2.9
SM717		No match	-4.4
SMk6		No match	+2.4
SMk68		No match	+3.2
SMk80		No match	+4.3
SMk112		No match	+2.1
SM1639		No match	-2.8
SMk148		No match	+2.9
SM1665		No match	+9.8
SMk95		No match	+2.1
SMk152		No match	+6.4
SM1897		No match	+2.6
SMk138		No match	+3.1
SM796		No match	-2.2
SMk342		No match	+3.9
SMk181		No match	+4.4
SM904		No match	-2.7
SMk262		No match	+2.7
SM9		No match	+2.9
SM1964		No match	+2.6
SMk335		No match	+3.8

<55> †: 일치하는 accession no.

<56> **: 데이터베이스와 일치하는 정보

<57> No match: 데이터베이스에서 일치하는 정보가 없음; 신규한 EST

<58> ESM: early stage muscle(체중 30 kg), ESF: early stage fat(체중 30 kg)

<59> SM: 돼지 근육

<60> 표 2에 나타난 바와 같이, 13개의 유전자들로는 ESM에서 발현되는 트로포닌-C, L-락테이트 디하이드로게나아제 M 체인, LIM 도메인 1 단백질, 피루베이트 키나아제, 리보솜 단백질 P0, 트랜스퍼 RNA-Trp 신타아제가 있다. M1형과 M2형 이소자임을 코딩하는 인간의 피루베이트 키나아제 M(PKM) 유전자를 포함하는 게놈 클론을 분리한 후 그들의 엑손 염기서열을 측정하였다. 상기 유전자는 대략 32 kb이며, 12개의 엑손과 11개의 인트론으로 구성되어 있다. 엑손 9와 10은 각각 M1과 M2형에 특이적인 염기서열을 포함하고 있으며, 이는 인간의 이소자임이 쥐의 유전자의 경우처럼 선택적 스플라이싱에 의해 동일한 유전자로부터 생산됨을 말하는 것이다. LIM 도메인 단백질 1(FHL1)은 초기에는 4개의 LIM 도메인과 징크 핑거와 같은 GATA 1개를 갖는 풍부한 골격 근육 단백질을 코딩하였다. FHL1은 다양한 조직에서 뿐만 아니라 골격 근육에서 발현되는 것으로 보였다. 최근에, 선택적으로 삽입된 FHL1 mRNA가 C-말단이 잘린 단백질을 코딩하는 것으로 확인되었다. FHL1C는 새로이 확인된 시작 코돈에 의해 결과적으로 돼지의 골격 근육에서 16개의 아미노산으로 된 N-말단을 생산함이 알려지게 되었다. 상기 결과로부터 이들 유전자들은 육질과 관련된 후보 유전자로 평가하였다.

<61> 결과적으로, 발현율은 ESM vs ASM 및 ESM vs ESF에서 확인된 유전자들에 대해 2배 이상으로 측정되었다. cDNA 마이크로어레이 분석을 통해 유의하게 과다발현되는 총 128개의 유전자를 확인하였다. 액틴, 베타-미오신, 글리코젠 포스포릴라아제, 미오신 헤비 체인, 신규한 유전자들, 피루베이트 키나아제, 트로포닌 C는 ESM에서 특이적으로 발현되었다. 콜라겐, 피브로넥틴, 메탈로프로티나아제 3의 억제제, 인터그린 베타-1 서브유닛은 ESF에서 특이적으로 발현되었다. 1-알파 디네인 헤비 체인, 601446467F1, 가상 단백질, 피브로넥틴 전구체, MHC class I, 신규한 유전자들, 익명의 단백질 산물들은 ASM에서 특이적으로 발현되었다. 이들 유전자들은

육질과 관련된 후보 유전자들로 평가하였다. 또한, 본 발명자는 앞으로 보다 많은 유전자 기능을 연구함으로써 고육질의 돼지를 육성할 것이다.

<62> 실시예 2: 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩의 제작

<63> 상기 실시예 1에서 검색된 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자로 ESM-특이유전자인 액틴, 베타-미오신, 글리코젠 포스포릴라아제, 미오신 헤비 체인, 신규한 유전자들, 피루베이트 키나아제 및 트로포닌 C 코딩 유전자과 ASM-특이유전자인 1-알파 디네인 헤비 체인, 601446467F1, 피브로넥틴 전구체 및 MHC class I 코딩 유전자를 DNA 마이크로어레이 상에 고착시켜 제조예 1의 방법에 따라 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩을 제작하였다.

<64> 실시예 3: 본 발명 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 키트의 제작

<65> 상기 실시예 2에서 제작된 기능성 cDNA 칩, Cy5-dCTP 또는 Cy3-dCTP과 결합시킨 검색 조직의 RNA에서 얻은 cDNA, 형광스캐닝시스템 및 컴퓨터분석시스템으로 이루어진 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 키트를 제작하였다.

【발명의 효과】

<66> 상기 실시예를 통하여 살펴본 바와 같이, 본 발명은 돼지의 성장단계별 근육특이유전자의 발현 프로파일의 검색 및 이를 이용한 기능성 cDNA 칩에 관한 것으로, 본 발명은 돼지의 근육과 지방 조직에서 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는

근육특이유전자의 발현 프로파일을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기에서 검색된 근육특이유전자만을 집적하여 제조된 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 기능성 cDNA 칩을 이용하여 돼지 품종별 육질의 평가 및 고육질의 돼지를 육성하는데 응용될 수 있으므로 양돈산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 근육특이유전자로 구성된 프로브 및 상기 프로브가 고정된 기질을 포함하는 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 프로브 DNA는 ESM-특이유전자와 ASM-특이유전자를 포함함을 특징으로 하는 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 ESM-특이유전자는 액틴, 베타-미오신, 글리코겐 포스포릴라아제, 미오신 헤비 체인, 피루베이트 키나아제 및 트로포닌 C 코딩 유전자를 포함함을 특징으로 하는 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 ASM-특이유전자는 1-알파 디네인 헤비 체인, 601446467F1, 피브로넥틴 전구체 및 MHC class I 코딩 유전자를 포함함을 특징으로 하는 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 기능성 cDNA 칩.

【청구항 5】

제 1항 기재의 돼지의 성장단계에 따른 근육특이유전자가 집적된 기능성 cDNA 칩,
Cy5-dCTP 또는 Cy3-dCTP과 결합시킨 검색 조직의 RNA에서 얻은 cDNA, 형광스캐닝시스템 및 컴
퓨터분석시스템으로 이루어짐을 특징으로 하는 돼지의 육질 진단 및 특이유전자 검색용 키트.